

XI SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 29 DE ABRIL DE 2003

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

**LA ADHERENCIA BACTERIANA
EN LA PATOGENIA DE LAS ITU**

***BACTERIAL ADHERENCE IN PATHOGENESIS
OF URINARY TRACT INFECTIONS***

Por el Excmo. Sr. D. GONZALO PIÉDROLA ANGULO

Académico de Número

**VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS
DE LA HEPATITIS C Y SU RELACIÓN CON
LA CLÍNICA Y EL TRATAMIENTO**

***GENETIC VARIABILITY OF THE VIRUS
OF THE HEPATITIS C AND THEIR RELATIONSHIP
WITH THE CLINIC AND THE TREATMENT***

Por la Excma. Sra. D.^a M.^a DEL CARMEN MAROTO VELA

Académico de Número

LA ADHERENCIA BACTERIANA EN LA PATOGENIA DE LAS ITU

BACTERIAL ADHERENCE IN PATHOGENESIS OF URINARY TRACT INFECTIONS

Por el Excmo. Sr. D. GONZALO PIÉDROLA ANGULO

Académico de Número

Resumen

La posibilidad de una colonización y posterior infección urinaria se debe a un primer contacto entre una serie de estructuras de las bacterias, denominadas adhesinas (fímbricas o no-fímbricas) y unos receptores o ligandos de la superficie del epitelio urinario. Las fimbrias bacterianas de *Escherichia coli*, de las que se han estudiado hasta siete tipos diferentes, son estructuras proteicas codificadas por el ADN cromosómico, siendo las más importantes las del tipo 1, en relación con la colonización de las vías bajas, y las tipo P, con las cistitis y pielonefritis. Se estudian con detalle sus distintos componentes proteicos y la muy compleja regulación genética de su producción, hecho de gran interés en la patogenia de estas infecciones y en la posibilidad de su prevención. Los receptores de cada tipo de fimbria son también químicamente diferentes, y su conocimiento explicaría datos clínicos importantes.

Abstract

The possibility of a colonization and later urinary infection is due to a first contact among a series of structures of the bacterium, denominated adhesins (fimbric or no-fimbric) and some receivers or ligands of the surface of the urinary epithelium. The bacterial fimbriae of *Escherichia coli*, of those that have been studied up to seven different types, are protean structures coded by the chromosomal DNA, being the most important those of type 1, in connection with the colonization of the low roads, and the type P, with the cystitis and pyelonephritis. They are studied with detail their different protean components and the very complex genetic regulation of

their production, made of great interest in the pathogeny of these infections and in the possibility of their prevention. The receivers of each fimbriae type are also chemically different, and their knowledge would explain important clinical data.

Las infecciones urinarias son el resultado de la interacción de la virulencia de las bacterias y una serie de factores específicos e inespecíficos de las defensas del hospedador. Son bien conocidas las rutas de la infección ascendente, linfática y hematógena, y como la vía ascendente predomina en las infecciones de la comunidad y la hematógena es casi exclusiva de las intrahospitalarias, con la excepción de las infecciones concurrentes con obstáculos en el arrastre de la orina, como son la litiasis urinaria, el embarazo, los tumores y las anomalías congénitas. La más importante es la vía ascendente, lo que explicaría la mayor frecuencia de cuadros por razones anatómicas en las mujeres (la uretra es más corta y se encuentra más cercana al área perineal), tras el coito, y sobre todo, después del uso de sondas permanentes vesicales. Pero todos estos factores, ascendentes o descendentes, lo único que favorecen es el contacto continuado de las bacterias con el urotelio (según los estudios experimentales de Gordon y Riley en 1992 sería necesaria la permanencia de 50 minutos en la vejiga urinaria para producirse la adherencia), y por ello desde hace unos años el estudio de la patogenia de las ITU está orientado a ese contacto bacteria-célula epitelial, que indicaría el comienzo de todo el proceso infeccioso, previo a la colonización y posterior invasión en profundidad del epitelio.

Las infecciones urinarias comienzan generalmente por la colonización de la uretra por cepas de *Escherichia coli* procedentes del colon, previa o no a la también colonización, en las mujeres, de la vagina por dichas cepas (producida por alteraciones de la microbiota de los *Lactobacillus* o por acción de diversos espermicidas). En ambos casos son las fimbrias tipo 1 las responsables de la colonización. Las bacterias con mayor adherencia a células vaginales y periuretrales se seleccionarían para colonizar las regiones adyacentes al orificio uretral.

Aunque la ITU puede ser causada por muchos microorganismos, *Escherichia coli* sigue siendo el agente más importante. De todos los serotipos de esta bacteria, sólo unos pocos tienen la capacidad de colonizar e invadir el tracto urinario (01, 02, 04, 06, 07, 075, 0150), serotipos distintos a los causantes de los cuadros diarreicos de los

seis grupos diferentes, aunque todos ellos provienen de la microbiota fecal. De ahí que se hable de serotipos uropatógenos, para diferenciarlos de otros comensales; algunos de ellos están relacionados expresamente con casos de pielonefritis.

Hoy conocemos algunos de los factores de virulencia de dichos serotipos uropatógenos de *E. coli*, llamados **adhesinas**, que se unen a receptores de las células humanas. La adherencia es la interacción inicial de un microorganismo patógeno con su hospedador, paso previo para la invasión celular y la difusión de toxinas. Las adhesinas son moléculas microbianas que median la fijación del microorganismo a un receptor de la célula del hospedador. Una determinada adhesina puede unirse a más de un receptor, y un solo receptor puede ser reconocido por diferentes adhesinas. Las adhesinas son de dos tipos principales: las fimbrias y las adhesinas no-fimbrias.

FIMBRIAS

Las fimbrias son unas organelas filamentosas que surgen de la membrana externa de las bacterias y que poseen 2 a 8 nm de diámetro y hasta 15 nm de longitud, encontrándose colocadas alrededor de toda la bacteria, en un número de 100 a 1.000 por célula. Se diferencian de los flagelos por su menor longitud y grosor (15-20 nm) y por ser rectas (y no sinuosas), y de los pili sexuales de gran importancia en los fenómenos de transferencia genética, por su menor longitud. Están constituidas por unidades proteicas colocadas helicoidalmente a lo largo de una estructura cilíndrica; a dicha proteína de 20 kilodaltons se le conoce como pilina. Están codificadas por el cromosoma o núcleo bacteriano, a diferencia de las codificadas por plásmidos de *E. coli* enterotoxigénico. Las cepas de *E. coli* uropatógeno producen múltiples tipos de fimbrias de distintos serotipos, que ayudan a la bacteria a impedir la acción de las IgA de la mucosa epitelial. Por su morfología y estructura al microscopio electrónico, sus funciones y aglutinación de hematíes se han identificado varios tipos de fimbrias, agrupadas en dos grandes apartados, según que la adherencia a los receptores del urotelio sea inhibida o no por la manosa: MS (manosa sensibles) y MR (manosa resistentes).

La mayoría de las cepas uropatógenas de *E. coli* se unen de for-

ma muy específica a receptores, que son carbohidratos residuales de la estructura de glicoproteínas o glucolípidos. Si el residuo es la manosa, la unión es mucho más patente en las cepas que provienen de cuadros de cistitis, que en los de pielonefritis. Las fimbrias que se unen a estos receptores de manosa son del tipo 1 y la adherencia es inhibida en presencia de manosa (MS). Los epítomos de manosa son glicoproteínas provenientes, de las células del urotelio, así como de la IgA secretoria y la proteína de Tamm-Horsfall del moco urinario (PTH, segregada por las células del tramo ascendente del asa de Henle, muy rica en residuos de manosa), que actúa como un slime o biofilm, al que se unen con gran avidez las fimbrias tipo 1 de *E. coli*. La PTH se une fuertemente a las fimbrias 1 y S, lo que puede impedir la adhesión a los receptores celulares del urotelio.

Las fimbrias tipo 1 (tabla 1) están codificadas por un conjunto o clouster de **nueve** genes, denominados *pil* o *fim*. El gen *fim A* codifica la subunidad proteica base de la fimbria, que puede expresarse independientemente del *fim H* que codifica la proteína H, que es la que se adhiere a la célula hospedadora. Las fimbrias tipo 1 se obtienen de la mayoría de los cuadros clínicos de UTI, pero no especialmente de los cuadros de pielonefritis. La proteína H de la fimbria también se une a receptores manosa de los PMN, lo que hace que las bacterias fagocitadas sean rápidamente destruidas en el interior de aquéllos. Incluso se ha comprobado que *E. coli* desprovistos de fimbrias tipo 1 que alcanzan la pelvis renal sobreviven en el interior de los PMN, además al abrigo de los antibióticos, y serían responsables de las recaídas de la bacteriuria.

Las fimbrias tipo 1 serían, además, responsables de la adherencia bacteriana a las sondas urinarias, de tanta importancia en las infecciones de sujetos hospitalizados. También se ha comprobado que el uso de clotrimoxazol (trimetropim-sulfa) en la prevención de las ITU reduce la síntesis, expresión y función adhesiva de las fimbrias tipo 1, a dosis por debajo de las C.M.I.

Las fimbrias P de *Escherichia coli* (tabla 1) son las mejores estudiadas y se encuentran frecuentemente en los aislados clínicos. Alrededor del 95% de las cepas aisladas en niños y del 50 al 90% de los adultos con pielonefritis, expresan fimbrias P. Estas se unen tanto al urotelio, como a los hematíes humanos del grupo sanguíneo P; de ahí su nombre. Las fimbrias P poseen una subunidad proteica polimerizada llamada Pap A, la **fibrilina**, proteína estruc-

TABLA 1

Principales fimbrias de las cepas uropatógenas de *Escherichia coli*.

<i>Adhesina</i>	<i>Gen</i>	<i>Receptor</i>
Fimbrias tipo 1 (MS)	<i>pil, fim</i>	D-manosa de células. epiteliales y glicoproteínas PHT, IgAs, y de PMN
Fimbrias P (MR)	*clase I: <i>pap G</i> ₁₉₆ *clase II: <i>pap GAP</i> **clase III: <i>prs</i>	Gal (a1- 4) Gal (grupo sanguíneo P)
Fimbrias S (MR)*	<i>sfa</i>	Siálico (a2—3)-galactósido
Fimbrias tipo F _{1c} (MR)*	<i>fac</i>	Galactosil-ceramida
Fimbrias G (MR)		Terminal N-acetil-glucosamina
Fimbrias M (MR)		Galactosa-N-acetil-glucosamina
Familia DR* (fimbrias o no)	<i>dra</i> (gen E) <i>afa</i> E1-5 <i>afa</i> F	Antígeno del grupo sanguíneo Dr

* Fimbrias asociadas con pielonefritis

** Fimbrias asociadas con cistitis

tural de las fimbrias, y una proteína Pap G que es la adhesina, que se encuentra en el extremo terminal de la fimbria y es esencial en la patogenia de la pielonefritis. (Pap viene de **Pili** asociados con **pielonefritis**). Las mujeres con infecciones recurrentes tienen una probabilidad dos a tres veces mayor de ser no productoras de la sustancia del grupo sanguíneo P.

Las fimbrias P están constituidas por nueve proteínas distintas, que de la membrana externa del *E. coli* al exterior son: la H de anclaje a dicha membrana, la proteína polimerizada principal A, la K, la E, la F y la G final. *K, E, F* y *G* codifican las proteínas fibrilares, siendo K la que une la proteína E del asta de la varilla a la principal A. F adapta la unión de la E a la G, que es la verdadera adhesina. Además existen las proteínas D y J que son chaperoninas, y la proteína C, acomodador o conserje, que luego citaremos.

Los receptores de las fimbrias P son glicolípidos (ceramida) ricos en **globobiosa**, un disacárido a-D-galactopiranosil-(1,4)-b-D-galactopiranososa (Gal-Gal). Estos glicolípidos y glicoproteínas recepto-

res están ampliamente distribuidos en todo el aparato urinario del 99% de la población, y en particular en el riñón. Parece ser que estas estructuras están cargadas negativamente (igual que la superficie de la bacteria), mientras que la proteína G terminal de la fimbria lo está positivamente, lo que llevaría a la unión electrostática. Pero este mecanismo no explicaría por sí solo la unión, pues existen adhesinas no fimbricas que unen estructuras superficiales de la bacteria y la célula epitelial.

La biosíntesis, ensamblaje y regulación de las fimbrias P, que ocurren principalmente a 37°C, están codificadas por el operón *pap*, un cluster de genes que se encuentra en el cromosoma bacteriano. Es un proceso complejo, donde intervienen junto a las proteínas estructurales de la fimbria, numerosas proteínas auxiliares. Este operón *pap* se encuentra en el 5-10% de las cepas de *Escherichia coli* de origen fecal y en el 90% de las aisladas de pielonefritis de los niños. En una primera etapa de la síntesis, se forman por una parte la proteína principal A, con la intervención de **chaperoninas** configuradoras de la estructura tridimensional (J-O), y por otra los componentes más distales (G, F y E), transportados y ensamblados por chaperoninas D y O-J. Todas estas proteínas son llevadas a la membrana externa, donde una proteína C, usher, «andamio» o acomodador molecular ayuda a traslocar las subunidades de las fimbrias a través de la membrana; la proteína C también actúa como de ensamblaje de toda la estructura fibrilar, primero de las proteínas más lejanas y responsables de la adherencia, y después de la proteína principal A. La proteína periplásmica H señala la terminación o final del proceso de polimerización y extrusión de la fimbria y ancla la misma a la pared celular.

La regulación genética de este proceso es muy compleja. En el cromosoma de *E. coli* los **once** genes del operón *pap* se encuentran dispuestos de la siguiente manera:



papI y *papB* son genes reguladores; **A** codifica la proteína principal que se polimeriza para formar el bastón de la fimbria, H la de anclaje y terminación, C el «andamio», D y J son chaperoninas. *K, E, F* y *G* codifican las proteínas fibrilares, siendo K la que une la proteína E del asta de la varilla a la principal A. F adapta la unión de la E a la G, que es la verdadera adhesina.

Como en todos los procesos de este tipo, en el operón existen genes reguladores, promotores, operadores y estructurales, que transcriben a un ARNm monocatenario policistrónico la información de la producción de las proteínas. *PapI* y *papB* codifican positivamente proteínas reguladoras necesarias para la expresión de los genes estructurales. Los genes estructurales son transcritos por un solo promotor, P_{BA} , que pone en marcha los genes *papA* y *papB*. El gen P_1 es el promotor del gen *papI*, y actúa en sentido inverso.

La regulación de los genes *pap* es muy compleja, y utiliza un mecanismo de variación de fase, tipo «off/on». La expresión de los genes es variable según la temperatura, la concentración de glucosa y ciertos aminoácidos en el medio. El modelo de actuación sería el siguiente:

El gen promotor contiene dos sitios para la metilación del DNA (**Dam**) en los residuos de la secuencia GATC, que existe en los sitios 1028 y 1130. Esa metilación es la que configura el on o el off, Pero la actuación de la metilasa Dam necesita de un regulador muy común en los genes de *E. coli*, que es la proteína de respuesta a la leucina o **LRP**. La metilación en el sitio P_{BA} es necesaria para que se una a la forma activa de LRP. El complejo **LRP-PapI** debe estar no metilado para configurar la forma «on». Si LRP y LRP-PapI están unidos en los sitios apropiados y **CBP** (cAMP-binding protein) se une a ellos junto a PapB, se forma el complejo activo («on») y los genes de los pili pueden ser transcritos desde P_{BA} . La transcripción del otro promotor P_1 controla los niveles de PapI. LRP y CRP explicarían como el operón se regula por los niveles de aminoácidos y glucosa, respectivamente. La regulación por la temperatura se hace por una proteína tipo histona (H-NS)

Las fimbrias P poseen unas considerables variaciones antigénicas, que las pueden dividir en múltiples subgrupos. Así la adhesina terminal Pap G posee tres variantes moleculares, codificadas por alelos del *pap G* de importancia clínica, ya que Johnson demostró en 1998 que el alelo II predomina en los casos de pielonefritis y bacteriemia, mientras que el III aparece en niños y mujeres con cistitis.

Los genes de la síntesis y ensamblaje de las fimbrias P manosa-resistentes se encuentran en un cluster muy cercano a los de la síntesis y excreción de la hemolisina HlyA, el factor 1-necrotizante y la aerobactina (un sideróforo), importantes factores de virulencia de las cepas de *E. coli* pielonefritógenas. A las regiones que contienen estos clusters de genes, se les ha denominado bloques de genes de

virulencia, y son prototipo de los actualmente llamados **islotes de patogenicidad asociada (PAI)**, que están ausentes en *Escherichia coli* fecales no uropatógenos. Están flaqueados por segmentos repetitivos de DNA y pueden ser transferidos en bloque a otras bacterias, mediante elementos genéticos móviles, como los transposones. Se está desarrollando una sonda genética conjunta que reconozca estas cepas, lo que para el clínico constituiría una herramienta muy útil en la adopción de una actitud terapéutica y en el establecimiento de pautas preventivas. Así, el aislamiento de cepas de *Escherichia coli* portadoras de PAI en mujeres adultas o ancianos con bacteriuria asintomática podría sentar una base razonable para que estos casos fuesen tratados con antibióticos.

Como las fimbrias se rompen y se pierden fácilmente, hay un continuo proceso de producción de nuevas fimbrias. Las fimbrias proteicas producen en el hospedador anticuerpos específicos, que se unen a ellas y las neutralizan. Pero se ha demostrado en *Neisseria gonorrhoeae* y en *E. coli* uropatógenos, que los genes de las proteínas estructurales de las fimbrias se encuentran en continua mutación, lo que produce variaciones antigénicas, por lo que es casi imposible hallar una respuesta humoral que prevenga la colonización a nivel de los respectivos epitelios, uretral y urinario.

En diferentes estudios experimentales con distintos modelos animales, se ha comprobado que el uso de vacunas con antígenos P, producen anticuerpos que previenen la inoculación posterior con cepas de *E. coli* poseedoras de fimbrias. Estos estudios comenzaron con el uso de vacunas de fimbrias de *E. coli* productoras de diarreas en los cerdos. Posteriormente se han realizado múltiples experimentos con fimbrias P purificadas de uropatógenos, clase II de PapG, tanto en ratones como en primates, con buenos resultados en las pruebas posteriores de inoculación con distintas cepas, consiguiéndose la protección contra la pielonefritis: protección que es más eficaz mientras más alto es el título de anticuerpos antifimbrias P. La aplicación de la tecnología del ADN recombinante para expresar epítomos protectores específicos, puede aumentar la eficacia de estas vacunas de fimbrias. El uso en humanos de estas vacunas y su efectividad está en desarrollo y por dilucidar.

Además de las fimbrias tipo 1 y tipo P, existen otras (tabla 1), como la S (7% de las cepas uropatógenas), F_{1c}, G y M (todas ellas manosa resistentes) y que han sido identificadas en cepas uropatógenas de *Escherichia coli*.

Las fimbrias S son manosa resistentes y se denominan así porque se unen a un receptor sialogalactósido de los hematíes humanos. Es el ácido neuraminil-a-(2-3)-galactosa-b-(1-3)-N-acetilglucosamina. Este receptor también se une a las cepas productoras de meningitis y septicemias. La familia de hemaglutinina Dr incluye adhesinas fimbricas y no-fimbricas. Cuatro genes han sido descritos como productores de las proteínas, que se adhieren al antígeno del grupo sanguíneo Dr, ampliamente distribuido a lo largo del epitelio del tracto urinario. Las cepas con estas fimbrias, a pesar de que tienen un bajo potencial invasivo, se han aislado de infecciones renales persistentes y podrían jugar un papel importante en pielonefritis crónica y nefritis intersticial.

Además de en *Escherichia coli*, en otros uropatógenos gramnegativos se han descrito fimbrias responsables de la adherencia al epitelio urinario. Por ejemplo, en *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp. y otras enterobacterias.

ADHESINAS NO-FÍMBRICAS

Se trata de **proteínas bacterianas superficiales no fibrilares** que se unen fuertemente a estructuras proteicas o hidrocarbonadas de la superficie de la célula del hospedador. Su conocimiento es escaso y un ejemplo de ellas son las adhesinas proteicas no fimbricas AFA-I, AFA-III y Dr de *E. coli* que reconocen un receptor común (el antígeno del grupo sanguíneo Dr), las adhesinas proteicas de *Pseudomonas aeruginosa* o la proteína Ipa (antígeno del plásmido de invasión) de *E. coli*. Así pues, hay una marcada diferencia entre los receptores de las adhesinas tipo fimbria que son glicolípidos o glicoproteínas, y los de las adhesinas no-fimbricas, que son proteicos o hidrocarbonados.

Los estudios de fimbrias y adherencia se han realizado siempre en bacterias gramnegativas. En las grampositivas aparecen adhesinas fimbricas (como la proteína M del *Streptococcus pyogenes*) y adhesinas no fibrilares, como la proteína F de la misma bacteria, que se une a la fibronectina de las superficies epiteliales. Así, se explicaría el papel de *Staphylococcus aureus* (que predomina en cistitis y pielonefritis ascendente) y *Staphylococcus saprophyticus* (que predomina en cistitis). Además, las fimbrias y los factores SSP-1 y SSP-2 de *Staphylococcus epidermidis* y la proteína AltE de *S. aureus*,

jugarían un papel muy importante en la adherencia de esta bacteria a las sondas urinarias y otros materiales plásticos.

* * *

La importancia de la adherencia bacteriana de las infecciones urinarias, como factor de virulencia, estaría incompleta si no se considera el papel importante de otros factores:

— Del **microorganismo**, como los flagelos (movilidad ascendente de *Proteus* spp.), la ureasa (también en el grupo *Proteus* o en *Klebsiella*), el antígeno polisacárido capsular K que inhibe la fagocitosis (*E. coli*, *Klebsiella*), las hemolisinas (HlyA de *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*, que facilitan la invasión tisular, lesionan el epitelio tubular renal), los sideróforos o sustractores de hierro, como la aerobactina, ya que las bacterias necesitan hierro para su crecimiento (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*), la resistencia a la actividad bactericida del suero, el factor citotóxico necrosante tipo 1, y las endotoxinas o LPS de la pared de las bacterias gramnegativas, tan importantes en la respuesta inflamatoria y en la disminución de la movilidad ureteral.

— Del **hospedador**, como el pH y la osmolaridad de la orina, la importantísima acción de arrastre, los inhibidores de la adherencia (PTH, mucopolisacárido de la vejiga, oligosacáridos de bajo peso molecular, IgAs, lactoferrina), la fagocitosis y ciertas linfocinas, elaboradas precisamente por los fenómenos de la adherencia bacteriana, y los LPS de la pared microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

- BACKHED, F.; ALSÉN, B.; ROCHE, N.; ANGSTRÖM, J.; VON EULER, A.; BREIMER, M. E.; WESTERLUND-WIKSTROM, B.; TENEBERG, S.; RICHTER-DAHLFORS, A.: «Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation». *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 18198-18205.
- FALAGAN, M.; GORBACH, S.: «Practice guidelines: urinary tract infections». *Infect. Dis. Clin. Pract.* 1995; 4: 241-257.
- GOLUSZKA, P.; POPOV, V.; SELVARANGAN, R.: «Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule dependent invasion to the HeLa epithelial cell line». *J. Infect. Dis.* 1997; 176: 158-167.
- GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H.: «Pathogenicity islands: Bacterial evolution in quantum leaps». *Cell.* 1996; 87: 791-794.

- HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLSDORFER, I.; TACHAPE, H.: «Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution». *Mol. Microbiol.* 1997; 23: 1089-1097.
- HULTGREN, S. J.; NORMARK, S.; ABRAHAM, S. N.: «Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili». *Annu. Rev. Microbiol.* 1991; 45: 383-415.
- HUNG, C. S.; BOUCKAERT, J.; HUNG, D.; PINKNER, J.; WIDBERG, C.; DEFUSCO, A.; AUGUSTE, C. G.; STROUSE, R.; LANGERMANN, S.; WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J.: «Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection». *Mol. Microbiol.* 2002; 44: 903-915.
- JOHANSON, J. M.; PLOS, K.; MARKLUND, B. I.: «*Pap*, *papG* and *prsG* DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract». *Microb. Pathog.* 1993; 15: 121-129.
- JOHNSON, J. R.: «Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection». *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4: 80-128.
- KUEHN, M. J.; HEUSER, J.; NORMARK, S.: «P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips». *Nature.* 1992; 356: 252-255.
- LINDBERG, F.; LUND, B.; JOHANSSON, I.: «Localization of the receptor-binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus». *Nature.* 1987; 328: 84-87.
- MARTÍNEZ, J. J.; HULTGREN, S. J.: «Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*». *Cell Microbiol.* 2002; 4: 19-28.
- Mulvey, M. A.: «Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*». *Cell Microbiol.* 2002; 4: 257-271.
- PETRI, W. A.; MANN, B. J.: «Microbial Adherence». En MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R.: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5.^a ed. Churchill Livingstone. Philadelphia, 2000, 13-21.
- Salyers, A. A.; Whitt, D. D.: «Bacterial Pathogenesis. A molecular approach». *ASM Press*. Washington. 1994.
- Sobel, J. D.; Kaye, D.: «Urinary Tract Infections». En MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R.: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5.^a ed. Churchill Livingstone. Philadelphia. 2000. 773-805.
- VAN DER WOUDE, M. W.; BRAATEN, B. A.; LOW, D. A.: «Evidence for global regulatory control of pilus expression in *E. coli* by Lrp and DNA methylation: model building based on analysis of *pap*». *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 2429-2435.
- VAN DER WOUDE, M. W.; BRAATEN, B. A.; LOW, D. A.: «Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*». *Trends Microbiol.* 1996; 4: 5-9.

INTERVENCIONES

Prof. Pérez Pérez

En primer lugar deseo felicitar al Prof. Piédrola Angulo por la magnífica exposición que acabamos de escuchar. Me ha impresio-

nado el papel de las adhesinas en la fisiopatogenia de procesos infecciosos y, en consecuencia, desearía preguntarle que desde mi punto de vista de especialista en reproducción animal, estamos considerando el papel de las referidas sustancias (de naturaleza proteica) en el mecanismo íntimo de la penetración del espermatozoide en el ovocito.

Ya el Prof. Botella, al tratar en esta Academia lo que llamó ventanas de implantación, subrayó la importancia de las integrinas o adhesinas en este proceso. Quisiera conocer la opinión del Prof. Piédrola respecto a la hipótesis que por ahora mantenemos referente a que las adhesinas elaboradas por la membrana pelúcida, sirven para fijar a la cabeza del espermatozoide a la referida membrana y condicionan la perforación de la misma para su penetración; de otra parte, las referidas adhesinas fijarían a la cola del espermatozoide evitando su total penetración en el ovocito. Este fenómeno es de singular importancia como avance para mejor conocimiento de la conjugación gamética.

Mi más cordial enhorabuena y sincera felicitación.

Prof. Domínguez Carmona

Nuevamente el Prof. Piédrola nos presenta un importante problema microbiológico con gran repercusión en la clínica y en la epidemiología. Yo quería preguntarle algunas cosas: la primera es la especificidad de los receptores de los factores de adhesión, pues pienso que la que establecen las *E. coli* uropatógenas sobre las sondas serán polímeros de a lo sumo dos monómeros sencillos. Otra pregunta relacionada con ésta es la especificidad de los receptores de la *N. meningitidis*, pues un acariciado proyecto es provocar en convivientes y en personas en riesgo de infectarse con este germen con otras neisserias no patógenas o incluso con la *N. meningitidis* desprovista de factores de adherencia. Hace muchos años estudié el caso de una señora que con su hijo estuvo en Portugal en donde el niño desarrolló una meningitis meningocócica; al regresar a Santiago de Compostela fue sometida, en contra de mi criterio a quimioprofilaxis y, como era de esperar, la señora no tuvo en los siguientes días meningitis, pero sí la tuvo hacia los diez días después; esto me llevó a comparar en los escolares de los colegios en los que habían aparecido casos de meningitis en los escolares contagiados. El resultado fue que la qui-

mioprofilaxis evitaba la enfermedad durante los escasos días en la que se suministró, pero que su empleo determinó, o al menos se asoció, con un espectacular aumento en los siguientes días de la enfermedad. Desde entonces pienso en la nueva vía de prevenir y de tratar infecciones de mucosas mediante el bloqueo de los receptores de microorganismos. Reitero mi felicitación.

Prof. Rey Calero

La espléndida conferencia del Prof. Piédrola merece la más cálida felicitación. Las infecciones del tracto urinario ITU han sido las más frecuentes. En el Epine del pasado año en que se estudian las infecciones nosocomiales, son superadas por las infecciones respiratorias. Pero como la actuación se basa en identificar la población a riesgo, diagnosticar el agente etiológico y prescripción reiterada de antibióticos, suponen una cuantía a precisar en los estudios de coste-beneficio.

Como nos ha indicado muy bien, hay que estudiar los factores predisponentes, como pueden ser en la mujer la cortedad de la uretra, en el niño la facilidad de infección con la flora circundante (variable según edades: en < 2 años, 8 % en niñas, 2 % en niños; en < 6 años, el 6 % y 2 % respectivamente; < 11 años, el 2 % y 1 %), las sondas permanentes, las anomalías anatómicas, la diabetes, los traumatismos, etc. El reflujo es siempre un factor agravante.

Pudiéramos destacar tres aspectos fundamentales. En primer lugar, los **mediadores de la inflamación en relación con el endotelio**, en cuatro familias: *las enzimas plasmáticas* (cascada de las kininas, sistemas de coagulación y fibrinolítico, plasminas), *las citokinas* (IL 1,6,8, TNF α), *quimioquinas* (MIP 1a,b proteínas inflamatorias de macrófagos), *lípidos inflamatorios* (ácido araquidónico, lisoPAF de las plaquetas), etc.

En un segundo apartado **las moléculas de adhesión**, que son proteínas localizadas en las membranas celulares, dependiendo de sus estructuras, se organizan en diversas familias: selectinas, similares a la mucina, globulinas, integrinas, etc., como tan precisa y científicamente nos ha descrito. Las *adhesinas*, en su mayoría como lectinas, son sialoconjugados. Estos sialoconjugados con capacidad hemaglutinante, que fueron descritas como manosa específicas o hemaglutininas, se definen como FIMH en los *E. coli* tipo I, y las que se ligan al ácido siálico SHAs, pueden estar, además del *E. coli* uropatogéni-

co y enterotosigénico, en pseudomonas, bordetellas, *H. pylori* y tantos otros. Es muy importante como las células bacterianas aprenden a reconocer en las células eucariotas a los receptores, con capacidad de activar el 2.º mensajero. El papel de los receptores juega, pues, un papel determinante en el anclaje de los microorganismos. También los virus tienen tal capacidad de adhesión y de hemaglutinación. Los coronavirus ahora con un especial protagonismo reconocen como receptores el antígeno carcinoembrionario, las aminopeptidasas y también residuos de ácido siálico, casi un receptor universal.

Las *integrinas alfa y beta* han caracterizado las ICAM 1,2,3, VCAM, MadCAM, FeCAM, etc. Hay que destacar que se ha pretendido hacer vacunas con pili, ya que si la bacteria carece de ellos, como ocurre en el gonococo, no puede fijarse al epitelio y ejercer su patogenicidad. También se ha pretendido con el CAM 99 para ciertos *E. coli* en patología veterinaria, pero como nos ha explicado muy bien, dada su variabilidad carecen de efectividad.

Un tercer aspecto a comentar: los **factores de virulencia**, como las cepas uropatogenas del *E. coli*, en que la alfa hemolisina (Hly), los factores necrosantes citotóxicos tipo 1 (CNP 1), las hemaglutininas S o R a la manosa, actúan o no en presencia de una solución de manosa, como la MRHA III, IV a,b, expresadas en cepas P fimbriadas o P relacionadas. Los diferentes serogrupos del *E. coli* más frecuentes en estos procesos suelen ser los serogrupos 2,4,6, etc. Otros factores de patogenicidad son las LPS endotoxinas, la cápsula *k*, los antígenos de la pared, que nos ha mostrado de un modo excelente y clarificador.

Ha expuesto con capacidad científica tan interesante tema, con los considerables aspectos de los *islotos asociados de patogenicidad*, con el comportamiento de estos microorganismos, pleno de consideraciones para la práctica médica, pues nos explica muchas de las recidivas de estos procesos y cómo hay que actuar frente a las ITU.

Prof. Espinós Pérez

Después de oír esta excelente y documentada exposición, como otras del Prof. G. Piédrola, no puedo dejar de pensar en las «maravillas de lo creado», así como en la «ordenada complejidad de los seres vivos», lo que pone en duda la idea del caos. Es preciso felicitarle.

Me ha interesado mucho el concepto de «colonización» y de «infección» y, en este caso, el papel tan importante de las «fimbrias» y de los genes que las codifican.

Quería preguntarle que, en la clínica de las infecciones del tracto urinario, nosotros damos mucha importancia al número de colonias, más de 100.000 por ml, tiene valor diagnóstico, en especial si va asociado a la presencia de piocitos (leucocitos adheridos entre sí).

¿Debemos darle ahora valor al marcador genético de la *Escherichia coli*? Somos conscientes de que hay bacterias asintomáticas, sin piuria, sin manifestaciones clínicas, que desaparecen espontáneamente. Aún así somos conscientes de la importancia del número de colonias, al igual que ocurre con la carga de meningococos en la rinofaringe o neumococos antes de aparecer el brote de meningitis o de neumonía. ¿Qué nos comenta de todo esto?

¿Qué papel juega la aerobactina, los sideroforos y el hierro en la patología por *Escherichia*? ¿Hay lactoferrina en el tracto urinario, como la hay en la mucosa bronquial en donde actúa como atrapador o quelante de hierro?

Me ha parecido muy interesante que haya mencionado al trimetropin-cotrimoxazol como agente eficaz, ya que ahora nadie lo señala en la lucha antibacteriana.

CONTESTACIÓN

Al Prof. Pérez Pérez

Yo de reproducción animal no debo hablar porque no es mi especialidad, pero haciendo una comparación entre el proceso de adherencia bacteriaana a una célula epitelial y el mecanismo de penetración del espermatozoide en el ovocito existe una similitud: la inyección de ADN de una celular en la otra. En ambos casos existen unas adhesinas y unos receptores (en el urotelio en el primer caso, y en la membrana pelúcida en el segundo) que son fundamentales e imprescindibles para receptores es fundamental. Pero creo que deben existir diferencias entre ambos mecanismos, ya que en la adherencia bacteriana al urotelio se trata de la unión entre una célula procariota y una eucariota, mientras que en la fecundación son dos celular eucariotas, las de ambos gametos.

Al Prof. Domínguez Carmona

Como en el discurso he citado, una determinada adhesina puede unirse a más de un receptor, y un receptor puede ser reconocido por diversas adhesinas. Esta situación le es muy favorable a la bacteria en el epitelio urinario. Situación muy distinta es la del epitelio faríngeo, donde a diferencia del urotelio, que en principio es estéril, aquí hay una variada y cuantiosa microbiota normal. La quimioprofilaxis que realizamos para la prevención de la colonización por *Neisseria meningitidis*, puede destruir otras bacterias comensales y saprofitas de la cavidad oral, y favorecer la apertura de receptores, colonización y posterior infección por el meningococo. De ahí los defensores o detractores de la quimioprofilaxis en las epidemias de meningitis epidémica por dicha bacteria. El bloquear receptores específicos de una determinada bacteria es un ideal, pero muchos de ellos son compartidos por otras especies bacterianas.

Al Prof. Rey Calero

Efectivamente, las infecciones urinarias nosocomiales siguen siendo de una alta frecuencia, sólo superada por las respiratorias. La utilización de las sondas urinarias (como la de los catéteres) favorece la formación de un biofilm, con lo que la posibilidad de la adherencia de la bacteria al epitelio es mucho mayor. En el epitelio urinario hay mínimas infecciones víricas, pues aunque existen receptores, el pH ácido y la acción de arrastre de la orina evitan la adherencia de estos microorganismos. Con respecto a las vacunas propuestas con pili, que evitarían la adherencia, como las de *Neisseria gonorrhoeae*, su efectividad hasta ahora no ha sido demostrada, pese a haber sido utilizadas en Madrás (India) por algunos autores, en la prevención de la infección gonocócica.

Al Prof. Espinós Pérez

Es un criterio reconocido por todos los autores el considerar que existe infección urinaria, cuando hay un crecimiento de más de 100.000 colonias por mililitro de orina emitida. Pese a ello, también se deben de tener en cuenta otros criterios a valorar, como si son

de una única bacteria o de varias especies distintas, o el de si la bacteriuria asintomática, podemos predecir con exactitud que terminará en infección urinaria clínica, si en las bacterias se encuentran dichos genes.

El hierro juega un papel importante en la vitalidad de las bacterias, y por eso poseen los sideróforos que extraen del medio en que se encuentran. Esto ha sido demostrado también en el tracto urinario, y en los islotes de patogeneidad antes citados, junto a los genes que condifican los pili, se hallan los de la hemolisina, el factor necrotizante y la aerobactina, sideróforo fundamental para proporcionar el hierro necesario a la bacteria.

Quiero, por último, agradecer a todos los que han intervenido el interés que han demostrado, y sus palabras de elogio, claramente inmerecidas, pues el estudio continuo de los temas de nuestra especialidad, no es más que una gustosa obligación.

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y SU RELACIÓN CON LA CLÍNICA Y EL TRATAMIENTO

GENETIC VARIABILITY OF THE VIRUS OF THE HEPATITIS C AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE CLINIC AND THE TREATMENT

Por la Excma. Sra. D.^a M.^a DEL CARMEN MAROTO VELA

Académico de Número

Resumen

Se estudian las principales características del genoma del virus de la hepatitis C, en especial aquellas partes tales como el IRES por su capacidad de unión al ribosoma de la célula, el HVR1 por su alta capacidad de replicación vírica, así como el sitio de unión a la PKR o el ISDR, dentro de la proteína NS5. Se definen los conceptos de genotipo, subtipo y cuasiespecie, y sus implicaciones en distintos aspectos tales como: 1) La patogenicidad (en la severidad del proceso infeccioso, en las manifestaciones extrahepáticas y en la aparición del hepatocarcinoma); 2) En la mayor o menor sensibilidad de las técnicas diagnósticas; 3) En la resistencia al tratamiento con interferón (bien a través de la vía NS3 o NS5, tanto a través de los cambios en PKR o las mutaciones en ISDR), y 4) en la epidemiología (cambios de variabilidad geográfica, utilización de esa variabilidad como marcador epidemiológico y dificultad de obtención de vacunas).

Abstract

The main characteristics of the genome of the virus of the hepatitis C is studied, especially those such parts as the IRES for its capacity of union to the ribosome of the cell, the HVR1 for its high capacity of viral replication, as well as the place of union to the PKR or the ISDR, inside the protein NS5. They are defined the genotype concepts, subtype and quasispecies, and their implications in different such aspects as: 1) pathogenicity (in the severity of the infectious process, in the extrahepatic manifestations and in the

appearance of the hepatocarcinoma); 2) in the biggest or smaller sensibility in the diagnostic techniques; 3) in the resistance to the treatment with interferon (well through the road NS3 or NS5, so much through the changes in PKR or the mutations in ISDR), and 4) in the epidemiology (changes of geographical variability, use of that variability like epidemic marker and obtaining difficulty of vaccines).

El virus de la hepatitis C fue inicialmente reconocido como el agente productor de la hepatitis no-A, no-B, y clonado de forma posterior (Choo 1989). Presenta una frecuente tendencia a la cronicidad en forma de cirrosis, hepatocarcinoma, etc., y su prevalencia es muy elevada, calculándose el número de infectados entre 170 y 200 millones (Lauer 2001). Esta prevalencia varía según los distintos países, su grado de desarrollo, e incluso las diferentes zonas y circunstancias sanitarias dentro de un mismo país.

Virus VHC

Como es lógico, no vamos a hacer un estudio en profundidad del virus, pero sí es necesario conocer algunas de sus características, con la finalidad de poder entender claramente el grave problema de su variabilidad genética (fig. 1). Es un virus ARN, de polaridad positiva, con 9.5 Kb, y un tamaño que oscila entre 55 y 65 nm. Tiene una cápside proteica y una envuelta, y taxonómicamente se encuentra encuadrado en los Flavivirus, aunque hoy en día se considera un nuevo género, el de los Hepacivirus. Como veremos más adelante, presenta una serie de genotipos, subtipos y cuasiespecies.

El genoma contiene un gran marco abierto de lectura único (fig. 2) de aproximadamente 3000 aa, flanqueados por regiones no traducidas altamente conservadas 5' y 3' UTR. De las dos, 5' es la mejor conservada, la que menos varía, con analogías superiores al 98%, y cuya principal función es permitir la unión del ribosoma de la célula huésped al ARN vírico en la estructura conocida como IRES.

Presenta dos regiones: una estructural, y otra no estructural. La primera es capaz de codificar las proteínas de la cápside (C) y las gp 31 y 70 (E_1 y E_2) de la envuelta. Queremos destacar que entre estas E_1 y E_2 se encuentra la zona denominada HVR₁ (hipervariable) de la que hablaremos posteriormente, por su elevada facilidad de escape al sistema inmunitario, y, por lo tanto, su capacidad de

Virus de la Hepatitis C (VHC)

Identificado en 1989

Flavivirus

ARN (+) 9.5 kb

Genotipos

Subtipos

Cuasiespecies



Complejo E1/E2

Envuelta

Capside

ARN

55-65 nm

FIGURA n.º 1.

VHC: genoma y replicación

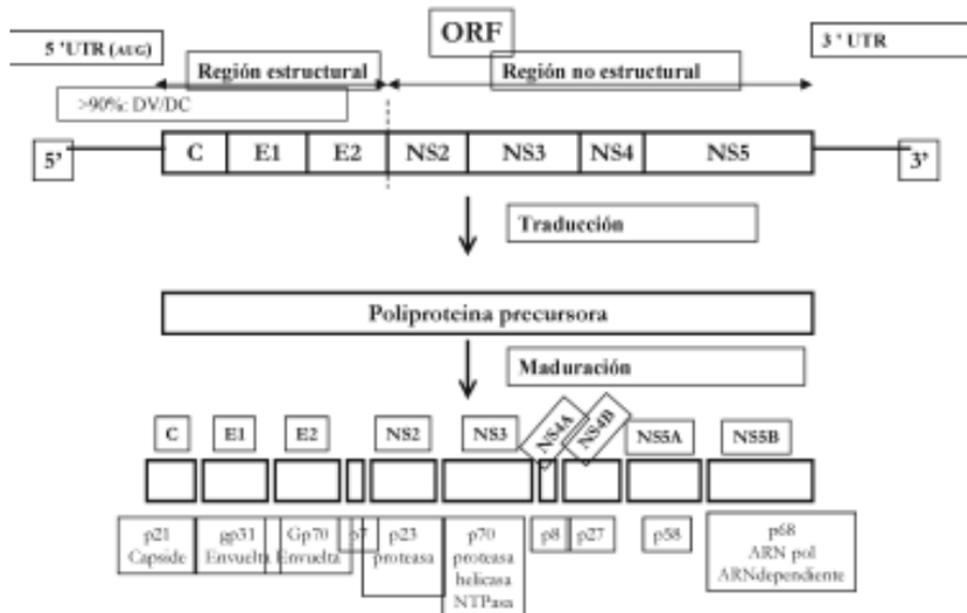


FIGURA n.º 2.

Proteína HCV NS5A (AS 1973-2419)

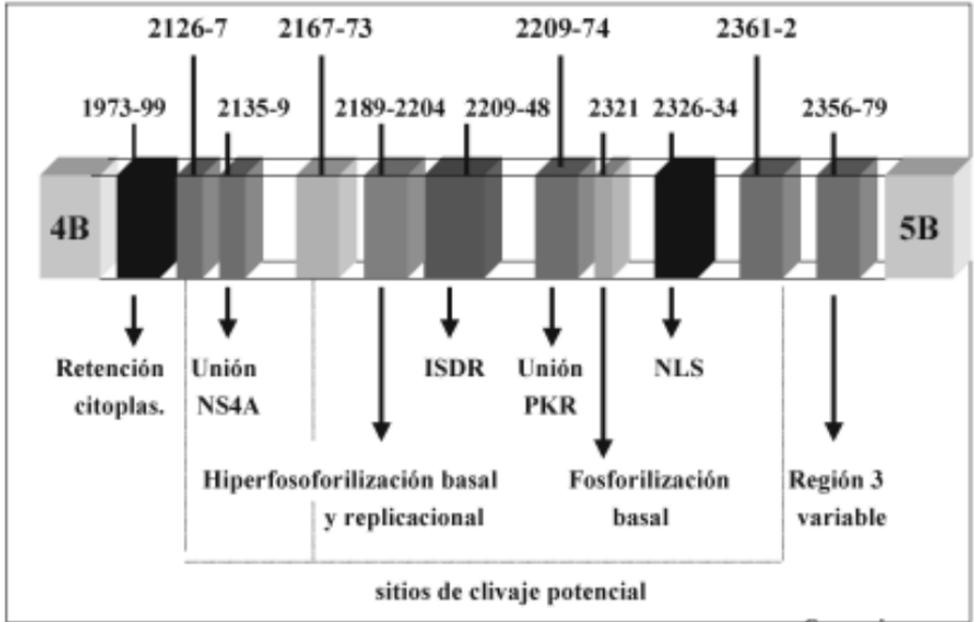


FIGURA n.º 3.

influencia en la aparición de infecciones persistentes y de fracasos terapéuticos. La segunda región, no estructural, codifica para toda una serie de enzimas con acción proteasa, helicasa, ARN polimerasa ARN dependiente, etc. Dentro de esa región, es importante reseñar el papel de NS₃ y, sobre todo, NS₅, por presentar el sitio de unión a PKR (Proteinkinasa) y la zona ISDR (región determinante de la sensibilidad a Interferón), ambas implicadas en los fenómenos de variabilidad y resistencia al tratamiento (fig. n.º 3). El virus tiene una vida media de 2.5 h en sangre, con una alta producción diaria, de 1.0x10¹² en los casos de infección crónica (por lo tanto, superior incluso a la del VIH).

Variabilidad genética

El concepto de cambio, de mutación, existe en la naturaleza desde siempre, pero, en este sentido, los microorganismos juegan con ventaja. Así, mientras que para que se produzca una nueva generación en la especie humana se necesitan aproximadamente 30

años, en las bacterias ocurre cada hora, y, en los virus, se hace todavía de forma más rápida, sobre todo en los ARN. Ahora bien, ¿por qué se produce esta variabilidad?. Preferentemente por tres razones:

1. Por incorporaciones erróneas de nucleótidos en los procesos de replicación debido a una falta de actividad correctora en las enzimas que regulan el proceso (replicasas, retrotranscriptasas, etc.).
2. Por recombinaciones homólogas entre virus con secuencias parecidas.
3. Por recombinaciones no homólogas entre virus de secuencias diferentes.

Todo esto quiere decir que de una célula infectada por un virus, se pueden obtener, a lo largo del tiempo, toda una serie de genomas víricos que estarían muy relacionados pero que no necesariamente deben ser iguales.

Conceptos genéticos sobre el VHC

En el VHC puede haber una elevada heterogeneidad de secuencias en diferentes individuos (variaciones de genotipo, subtipo y aislado) ó en el mismo individuo (cuasiespecies).

Según el grado de homología existente en sus genomas, decimos que pertenece al mismo genotipo cuando esa homología varía entre el 66-69% (o si se quiere, difieren en un 30%); dentro de un mismo genotipo, si el 77-80% son homólogos, hablamos de subtipo; dentro del subtipo, si la homología es del 91-95%, hablamos de aislado. Y, por fin, si la homología es muy alta (superior al 98%), (tabla nº 1) hablamos de cuasiespecies. Entendemos pues por cua-

Virus de la Hepatitis C

Clasificación Molecular	
Categorías	Homología (%)
• Genotipo	66-69
• Subtipo	77-80
• Aislado	91-95
• Cuasiespecies	>98

TABLA n.º 1.

siespecies, la existencia de genomas víricos **no** idénticos, pero genéticamente muy cercanos, que se hallan sometidos a procesos de variación, combinación y selección.

Por otra parte, existen diferentes grados de homología entre las diferentes regiones. Por ejemplo, la homología entre E_1 y NS_5 , que va subiendo según sean distintos genotipos, con igual genotipo y distinto subtipo, o con igual genotipo y subtipo, pero distinto aislado. Evidentemente la homología en estos últimos es más alta y, sin embargo, en las zonas de alta replicación de E_2 es más baja.

Genotipos

VHC estaría dividido en 11 genotipos (representados por números arábigos) y al menos 80 subtipos representados por letras como subíndices, aún cuando cada día se describen nuevos subtipos. Todos ellos estarían distribuidos geográficamente según la influencia de una serie de factores:

1. Influencia y selección inmune ya que, por ejemplo, algunos viriones tienen mutaciones en E_2 que impiden la acción de anticuerpos neutralizantes.
2. Los diferentes patrones de infección.
3. La mayor o menor capacidad o eficacia de su replicación.
4. La posible influencia (como ocurre en el VIH), de las migraciones poblacionales.

Implicaciones de la variabilidad genética del VHC

Las diferentes implicaciones de la variabilidad del VHC se producen en: la patogenicidad, el diagnóstico, los fenómenos de resistencia al tratamiento, así como en la epidemiología del mismo (Lunel, 1998).

1. *Importancia en la patogenicidad*

1.1. *En la severidad de la infección:*

De todos los genotipos, el 1b evoluciona más fácilmente a cirrosis y hepatocarcinoma (Benvegnu, 1997). Asimismo, la coinfección

por muchos genotipos puede estar implicada en formas más severas, aún cuando este hecho hay que tomarlo con extrema prudencia. Algo similar ocurre en la relación con las cuasiespecies. Por ejemplo, se ha demostrado que la región HVR₁ del VHC (de alta replicación) contiene ciertos epitopos que podrían seleccionar mutantes capaces de escapar al sistema inmune. En general, podemos decir que existe un alto número de cuasiespecies en función de la severidad del proceso, y que las hepatitis agudas resolutivas tienen un número de cuasiespecies menor que las crónicas activas (Farci, 1997).

Por otra parte, se ha comprobado (Fukuda, 2001) que en los genotipos 1b es más frecuente encontrar hepatitis B oculta (es decir, aquella que es ADN positiva, HBsAg negativas) y con una peor respuesta a interferón. Igualmente estaría relacionado con hepatitis fulminantes (Hu, 2002).

1.2. *En las manifestaciones extrahepáticas:*

Existen numerosos estudios que asocian la infección VHC con, especialmente, la crioglobulinemia (Agnello, 1997), aún cuando no es bien conocida su relación con los diferentes genotipos. En cualquier caso, una alta variabilidad podría ser responsable de ciertas manifestaciones autoinmunes como la citada crioglobulinemia, los autoanticuerpos y los complejos inmunes.

1.3. *En la aparición del Hepatocarcinoma (HCC):*

Como ya sabemos, un altísimo porcentaje de individuos infectados por VHC evoluciona a hepatitis crónica, y hepatocarcinoma.

La PKR (proteína mayor inducida por Interferón), se considera un gen supresor de tumores, controlador de la homeostasis y del crecimiento celular. En ciertas condiciones, la interacción de PKR con la zona NS₅ del virus conlleva su inactivación, lo que facilitaría el desarrollo del hepatocarcinoma (figura nº 4). Esto ocurre preferentemente en el genotipo 1b, pero también se ha estudiado en otros genotipos. Por otra parte, la expresión de otra región de VHC en determinadas líneas celulares, la NS₃, han inducido tumores en algunos modelos experimentales.

Estos hechos, unidos a los de Chang (1998) que publicó la posible relación entre las proteínas del core y la transformación en celular de roedores, así como las de Marusawa (1999) en el que dichas proteínas conferirían a las células infectadas un aumento de

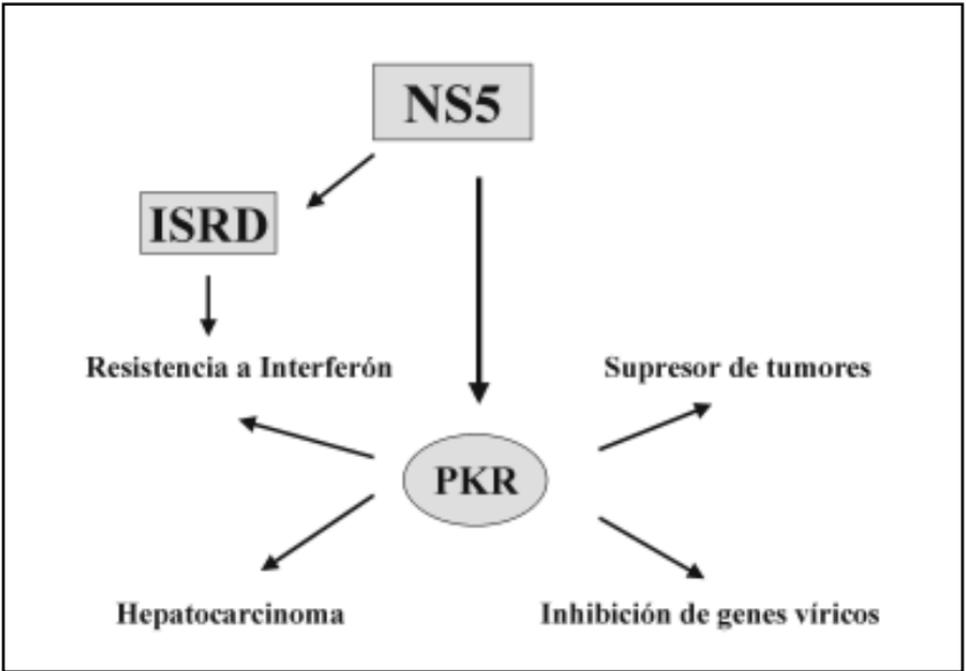


FIGURA n.º 4.

resistencia frente a los fenómenos de apoptosis, llevaron a comprobar la existencia de mutaciones en zonas más específicas. En este momento, existen varios grupos que presentan incluso diferencias notables en sus resultados. El grupo más antiguo, encabezado por Shimizu (1997), encontró diferencias significativas entre individuos con HCC y no HCC en relación a la aparición de mutaciones en la región hidrofílica situada entre los aminoácidos 39-76. Otro grupo, encabezado por Ruster (1956), encuentra mutaciones cerca de la región N terminal y, por el contrario, Giménez Barcons (2001) no encuentra diferencias significativas estudiando los 80 residuos terminales de esa misma región N terminal, hecho también encontrado por Ogata este mismo año (2002).

Por otra parte, el mismo Ogata, estudiando otras regiones (aminoácidos 1-20 y 141-160), sí encuentra diferencias claras, sugiriendo incluso que el hecho de encontrarlas tanto en tejidos cancerosos como no cancerosos implicaría que su desarrollo podría ser anterior a la aparición del hepatocarcinoma. El estudio de las otras regiones del core presentó algunas mutaciones, pero sin carácter significativo.

Para finalizar este apartado, es necesario comentar algunos de los últimos y más recientes avances en el campo de la variabilidad entre individuos con HCC y no HCC.

En el año 2001, Xu describió la existencia de una proteína, F, que es un producto del "frame-shift" de algunas cepas 1b en la zona del core y cerca del codón 11. Pues bien, Ogata (2002), estudiando esta proteína, no encontró diferencias significativas, aun cuando sí destaca la existencia de un mayor número de mutaciones. Por otra parte, Horie (1995-1997), encontró diferencias en el estudio del codón 45, de tal forma que los individuos con HCC tendrían una glicina, mientras que los no HCC tendrían una serina, y nuevamente Sahoshi Ogata (2002) insiste en que en dicho codón 45, la glicina estuvo conservada en todos los aislados.

2. *Importancia en el diagnóstico*

La mayoría de las técnicas utilizadas como screening se fabrican a partir de proteínas del genotipo 1, por lo que esto puede representar una falta de sensibilidad. Por otra parte, los tests moleculares, sobre todo los de cuantificación vírica pueden asimismo verse influenciados por los genotipos. Esto se ha visto en algunos kits como el DNA-b o el Monitor (Hawkins, 1997).

3. *Importancia en el tratamiento*

La respuesta a IF está claramente ligada al genotipo, de tal manera que los del genotipo 1 responden peor que los del 2 y 3. En cambio, el papel de los subtipos es menos claro. El por qué se produce este fenómeno se puede explicar por distintos mecanismos:

3.1. *Vía NS₅:*

Según vemos en la fig. nº 4, la PKR es una proteína que además de ser supresora de tumores, es capaz también de bloquear la expresión de los genes víricos. La interacción de PKR con la región NS₅-A puede inhibir la autofosforilización de dicha enzima y, secundariamente, su actividad kinasa. Existe, pues una interacción entre la proteína NS₅-A de los genotipos 1a y 1b, y el sitio catalítico de PKR, siendo éste el primer mecanismo descrito por el que el virus podría hacerse resistente al interferón.

Por otra parte, ya Enamoto (1996) publicó el incremento de mutaciones en una región NS_3 -A denominada ISDR, preferentemente situada entre los aminoácidos 2209-2248 en los aislados de individuos 1b (malos respondedores), y que el estudio de ISRD podría permitir predecir el tipo de respuesta. En esta misma línea se encuentra Sarrazin (2002) que en un reciente trabajo encontró que el principal foco de mutaciones relacionadas con la respuesta al interferón se encontraba en las regiones 2350-2390.

En cualquiera de los casos, creemos importante reseñar que por la simple cuenta de mutaciones es difícil establecer una relación completa con la respuesta, porque la observación de acúmulos de mutaciones varía según el número de regiones del genoma que hayan sido estudiadas.

3.2. Vía NS_3 :

Muy recientemente, Lam (2003), estudiando la región NS_3 (con acción ATPasa helicasa), ha encontrado en individuos infectados tres tipos de clones (fig. n.º 5) procedentes, del genotipo 2a (buenos respondedores) y de los 1a y 1b (no respondedores). Pues bien, aunque la diferencia de secuencias entre todos los genotipos era muy

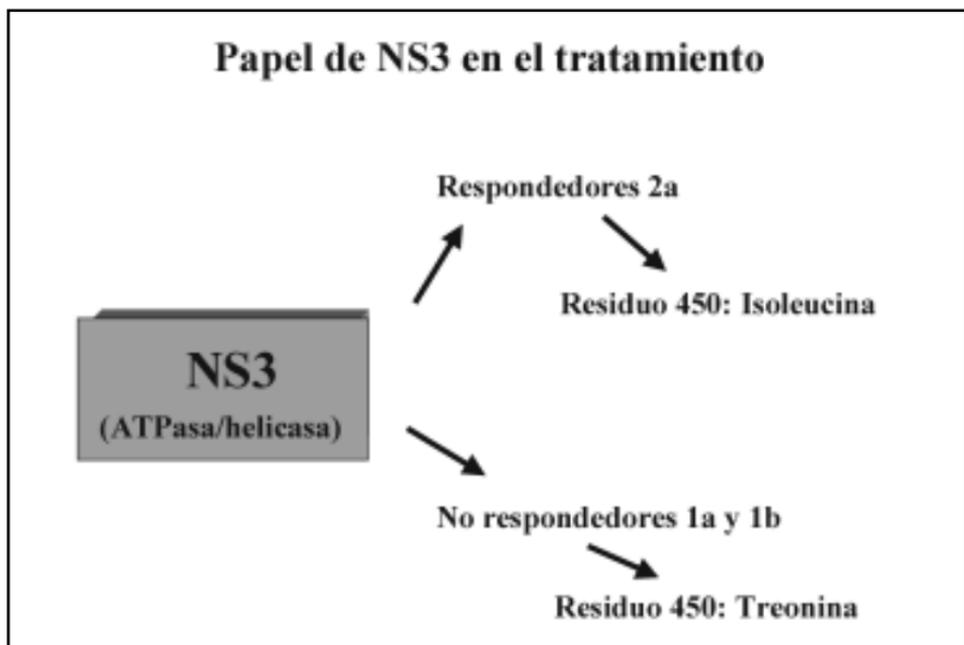


FIGURA n.º 5.

pequeña (alrededor del 15%), existía una variación clara en el residuo 450 que condicionaba la respuesta al tratamiento. En el caso de los respondedores, el aminoácido era una isoleucina y en el de los no respondedores, una treonina.

4. *Epidemiología*

4.1. *Variabilidad geográfica:*

La historia de la epidemiología del VHC está basada en la tasa de cambio de sus secuencias nucleotídicas, y según ciertos autores (Smith, 1997) y a partir de modelos matemáticos, el primer ancestro común del VHC se remontaría a más de 2000 años. La divergencia de genotipos sería desde hace 500 años y las diferencias entre 1a y 1b se remontarían a 300 años. En este momento existe una gran divergencia geográfica que se explicaría por los movimientos poblacionales, la existencia de la drogadicción y la contaminación por transfusiones sanguíneas.

La distribución mundial de genotipos es muy variada según los diferentes países siendo el 1, 2 y 3 los responsables de la mayoría de las hepatitis en Europa Occidental, USA y Japón. El 4 es más frecuente en Africa del Norte, Central y Medio Oriente. El 5 predomina en Africa del Sur, y del 6 al 11 en el Sudeste Asiático. En España, igualmente puede haber diferencias, aún cuando el más frecuente sigue siendo el 1b (Alonso 1997, Touceda 2000, Sola 2002, Rubio 2001, Bover 2001), dependiendo también de los grupos de riesgo. En un estudio de nuestro Departamento (del cual presentamos algunos datos en una comunicación anterior) encontramos un 26% del 1a (preferentemente en adictos a drogas por vía parenteral), 59% del 1b, 9% del 3a, 1% del 4a y un 7% mixtos. Algo similar ocurre cuando lo estudiamos en individuos VIH (la mayoría drogadictos) en los que existe una gran diferencia respecto al grupo control ($p < 0.01$) a costa de una menor presencia de 1b. Estos individuos 1b fueron más virémicos y con un grado más severo de hepatitis crónica (García 1996, Maroto 2001).

4.2. *Los genotipos como trazadores epidemiológicos:*

El estudio de los genotipos puede ser útil para el control de migraciones o del comercio de productos sanguíneos, pero en ambos casos este tipo de estudio es poco determinante para analizar

la transmisión entre individuos o para comprobar una contaminación por la misma cepa. Para eso son necesarios estudios filogenéticos más profundos a partir de diferentes regiones (HVR1-E2), lo que nos permitiría conocer la transmisión nosocomial, sexual o materno-filial.

4.3. *Vacunaciones:*

La gran variabilidad del VHC hace muy difícil la puesta a punto de un vacuna útil. Según diferentes estudios hechos en chimpancés, existen anticuerpos neutralizantes sólo específicos de cepa, por lo que sería necesario hacer "sopas" (Lunel, 1997) de antígenos que pertenecieran a diferentes cepas. Otra dificultad añadida sería la ausencia de un modelo animal (fuera del chimpancé), así como de sistemas eficaces de cultivo. No obstante, existen diferentes líneas de investigación abiertas utilizando proteínas de distintas zonas del core y vehiculizadas incluso por otros virus (Ezello, 2002).

Conclusiones

Como hemos podido comprobar, existe en el VHC una gran variabilidad genética, pero también existe una gran variabilidad de criterios en la forma de estudiarla, así como en su interpretación. Por lo tanto, es difícil establecer unos parámetros que relacionen dicha variabilidad con la evolución del proceso clínico y la mejor o peor respuesta al tratamiento..

Las razones a todo esto son muy variadas, pero se podrían resumir en tres:

1. En primer lugar, la diferente metodología empleada por los diferentes autores, ya que no es lo mismo manejar técnicas de amplificación de la polimerasa (PCR), técnicas de hibridación o técnicas de secuenciación. Por ejemplo, nosotros, comparando las dos últimas, encontramos una total concordancia para la determinación de genotipos, pero con peores resultados en el caso de la hibridación para subtipos, ya que esta técnica no era capaz de discriminar el 100% de los casos.

2. Las diferentes zonas del genoma estudiadas.

3. Las diferentes muestras de las cuales podemos partir para el estudio. Por ejemplo, en suero se encuentran casos positivos con menor frecuencia que en hígado, no guardando muchas veces un

paralelismo claro entre ellos, en el propio hígado, o en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En este momento se piensa que precisamente estos últimos pueden comportarse como reservorios para las variantes que han desaparecido del hígado como consecuencia de la presión del sistema inmune.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, P.; ORDUÑA, A.; SAN MIGUEL, A.; DOMÍNGUEZ, E.; BRALUZ, M.; GUTIÉRREZ, M.; EIROS, J.M.; INGLODA, L.; GONZÁLEZ, J.M.; RODRÍGUEZ TORRES, A.: «Relation of hepatitis C virus genotypes to risk factors and hepatic disease in Spanish patients». *Clin. Microb. Infect.* 1997. Feb.; 3 (6): 647-652.
- AGNELLO, V.: «The etiology and pathophysiology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection». *Springer Semin. Immunopathology.* 1997; 19 (1): 111.
- BABIK, J.; HOLODNY, M.: «Impact of highly active antiretroviral therapy and immunologic status on hepatitis C virus quasispecies diversity in human immunodeficiency virus/Hepatitis C virus-coinfected patients». *J. Virol.* 2003. Feb. 1940-1950.
- BENVENGU, L.; PONHSSO, P.; COVALETTI, D.; NOVENTA, F.; CHEMELLO, L.; ALBERTI, A.: «Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis». *Hepatology.* 1997; 25: 211-215.
- CHANG, J.; YANG, H.; CHO, G.; HWANG, B.; HAHN, S.; SUNG, C.: «Hepatitis C virus core from two different genotypes has a oncogenic potential but not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the virus oncogene». *J. Virol.* 1998; 72: 3060-3065.
- CHAO, Q.; KUO, G.; WEINER, A.; OVERBY, L.; BRADLEY, D.; HOUGHTON, M.: «Isolation of a C DNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome». *Science.* 1989, 244: 359-362.
- DAVIS, G.: «Hepatitis C virus genotypes and quasispecies». *Am. J. Med.* 1999. 107 (suppl. 6 B): 215-265.
- ENAMOTO, N.; SAKUMA, Y.; ASAHIMA, M.; KUROSAKI, T.; MURAKAMI, C.; YAMAMOTO, C.; IZUMI, N.; MARUMO, F.; SATO, C.: «Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by aminoacid substitutions in the NS5a region». *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 224-230.
- ENAMOTO, N.; SAKUMA, Y.; ASAHIMA, M.; KUROSAKI, T.; MURAKAMI, C.; YAMAMOTO, C.; IZUMI, N.; MARUMO, F.; SATO, C.: «Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection». *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 77-81.
- EZELLO, H.; MARKOVIC, D.; BARBER, G.: «Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector». *Journal of virology.* Dec. 2002: 12325-12334.
- FARCI, P.; BUKH, J.; PURCELL, R.H.: «The quasi-species of hepatitis C virus and the host immune response». *Springer. Semin. Immunopathol.* 1997; 19 (1): 5-26.

- FUKUDA, R.; ISHIMURA, N.; HAMAMOTO, S.; MORITONI, M.; VAHIDA, J.; ISHIHARA, S.; AKAGI, S.; WATANABE, M.; KINOSHITA, J.: «Coinfection by serologically silent hepatitis B virus may contribute to poor interferon response in patients with chronic hepatitis C by down regulation of type-I interferon receptor gene expression in the liver». *J. Med. Virol.* 2001; 63: 220-227.
- GARCÍA, F.; ROLDÁN, C.; HERNÁNDEZ-QUERO, J.; BERNAL, M.C.; MARTÍNEZ, M.A.; LÓPEZ, M.A.; PIÉDROLA, G.; MAROTO, M.C.: «Relation ship between viral genotype and viral load in patients with chronic hepatitis C». *Europ. J. Clin. Microb. Inf. Dis.* 1996; 15: 884-887.
- GIMÉNEZ BARCONS, M.; FRANCO, S.; SUÁREZ, Y.; FORNS, X.; AMPURDENES, S.; PUIG-BASA SORTI, F.; SÁNCHEZ-FUEYO, A.; BARRERA, J.M.; LLOVET, J.M.; BRUIX, J.; SÁNCHEZ TAPIAS, J.M.; RODES, J.; SÁIZ, J.: «High aminoacid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV.1b related cirrhosis». *Hepatology.* 2001; 34: 158-167.
- GÓMEZ, J.; CABOT, B.; NADAL, A.; PIRON, M.; ESTEBAN, J.; MARTELL, M.: «Virus de la hepatitis C: viabilidad genética y estructura del RNA». *Virología.* 1999, 6; 12: 31-49.
- HAWKINS, A.; DAVIDSON, F.; SIMMONDS, P.: «Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2 and 3 by quantiplex HCV RNA assay version 1 and 2 Roche monitor assay and an inhouse limiting dilution method». *J. Clin. Microb.* 1997; 35: 187-192.
- HORIE, C.; IWAHANA, H.; HORIE, I.; SHIMIZU, I.; YOSHIMOTO, S.; YOGITA, S.; TASHIRO, S.; ITO, S.; ITAKURA, M.: «Detection of different quasiespecies of hepatitis C virus core region in cancerous and non cancerous lesions». *Biochem. Biophys. Commun.* 1996; 218: 674-681.
- HORIE, T.; SHIMIZU, I.; HORIE, C.; YASUDA, M.; YOGITA, S.; TASHIRO, S.; ITO, S.: «Mutations of the core gene sequence of hepatitis C virus isolated from liver tissues with hepatocellular carcinoma». *Hepatol. Rev.* 1999, 13: 240-251.
- HU KE-QUIN: «Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications». *J. Viral. Hepatitis.* 2002; 9: 243-257.
- JOVER, R.; PÉREZ-SERRA, J.; DE VERA, F.; ALAMO, J.M.; MUÑOZ, C.; YAGO, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, R.; VIDAL, J.: «Infection by genotype 5A of HCV in a district of southeast Spain». *Am. J. Gastroenterol.* 2001. Oct. 96 (10); 3042-3043.
- LAM, A.; KEENEY, D.; ECKERT, P.; ENCK, D.: «Hepatitis C virus NS3 ATPases/helicases from different genotypes exhibit variations in enzymatic properties». *J. of Virol.* 2003, Ap: 3950-3961.
- LAUER, G.; WALKER, D.: «Hepatitis C virus infection». *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 41-52.
- LUNEL, F.; STUYVER, K.; BRECHOT, C.; MAERTENS, G.: «Mise au point sur le virus de l'hépatite C: variabilité et implications». *Transfus. Clin. Biol.* 1998; 5: 147-165.
- MAROTO, M.C.: «Estudio de los genotipos víricos en diferentes procesos infecciosos». *R. Acad. Nac. Med.* 2001. CXVIII, 2.º; 363-376.
- OGATA, S.; NAGANO-FUJII, M.; KU, Y.; YOON, S.; HOTTA, H.: «Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F pro-

- tein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma». *J. Clin. Microb.* 2002. Oct. 3625-3630.
- RUBIO, M.; RUBIO, C.; NOGUEZ, A.; MONONELLES, A.: «Genotipos del virus de la hepatitis C. Estudio de 302 pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana». *Med. Clin. (Barc.)*. 2001. Mayo 12; 116 (17): 650-651.
- RÜSTER, B.; ZEUZEN, S.; KRUMP-KONVALINKOVA, V.; BERG, T.; JONOS, S.; SEVERIN, K.; ROTH, W.: «Comparative sequence analysis of the core and NS5 region of hepatitis C virus from tumor and adjacent non tumor tissue». *J. Med. Virol.* 2001; 63: 128-134.
- SARRAZIN, C.; BERG, T.; LEC, J.; TEUBER, G.; DIETRICH, F.; ROTH, K.; ZEUZEN, S.: «Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy». *J. Hepatol.* 1999; 30: 1004-1013.
- SARRAZIN, C.; BERG, T.; LEE, J.; RUSTER, B.; KRONENBERG, B.; ROTH, K.; ZEUZEN, S.: «Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response». *J. Infect. Dis.* 2000, 181: 432-441.
- SARRAZIN, C.; HERRMANN, E.; BRUCH, K.; ZEUZEN, S.: «Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance. A new model for testing the reliability of mutational analyses». *J. Virol.* 2002. Nov. 11079-11090.
- SHIMIZU, I.; YAO, D.; HORIE, C.; YASUDA, M.; SHIBA, M.; HORIE, T.; NISHIKADO, T.; MENG, X.; ITO, S.: «Mutations in a hydrophilic part of the core gene of hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in China». *J. Gastroenterol.* 1997; 32: 47-55.
- SMITH, D.; PATHIRINA, S.; DAVIDSON, F.; LAWLER, E.; POWER, J.; LEE, J.; SIMMONDS, P.: «The origin of hepatitis C virus genotypes». *J. Gen. Virol.* 1997; 78: 321-328.
- SOLA, R.; CRUZ DE CASTRO, E.; HOMBRADOS, M.; PLANAS, R.; COLL, S.; JORDI, R.; SUNYER, M.; MORRUTGAT, J.: «Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different countries of catalonia, Spain: cross sectional study». *Med. Clin. (Barc.)*. 2002. Jun. 22; 119 (3): 90-95.
- THOMAS, D.; LEMON, S.: «Hepatitis C», en: *Enfermedades Infecciosas*. MANDELL, G.; BENNETT, J.; DOLIN, R., 2000. Churchill Livingstone. 5.^a ed. 2117-2144.
- TOUCEDA, S.; PEREIRA, M.; AGULLA, A.: «Prevalencia de genotipos del virus de la hepatitis C en el área de El Ferrol (La Coruña, España)». *Enf. Inf. Microb. Clin.* 2000, Mayo; 20 (5): 2000-2004.
- XU, Z.; CHOI, J.; YEN, T.; LU, W.; STROHECKER, A.; GOVINDARAJON, S.; CHREN, P.; SELBY, M.; OU, J.: «Synthesis of a novel hepatitis C virus protein ribosomal frameshift». *EMBO J.* 2001; 20: 3840-3848.
- ZIGNEGO, M.; FONTONA, R.; PULTI, S.; BORBAGLI, S.; MONTI, M.; CARECCIA, G.; GIANNELLI, F.; GIANNINI, C.; BUZZELLI, G.; ROSSENS, M.; BONINO, F.; GENTILINS, P.: «Relevance of inapparent coinfection by hepatitis B virus in interferon treated patients with hepatitis C virus chronic infection». *J. Med. Virol.* 1997; 51: 313-318.

INTERVENCIONES

Prof. Domínguez Carmona

Me viene a la memoria, después de escuchar la magnífica conferencia de la Profesora Maroto, aquello de los Reyes Católicos que todos Vds. conocen: «Tanto monta monta tanto Mari Carmen como Gonzalo». No pensaba intervenir, pues entre lo mucho que ignoro, la genética de los virus ocupa un lugar importante. Sin embargo, mientras escuchaba el cerebro daba vueltas al tema. Cuando se determina el genotipo de un virus que se ha aislado de un enfermo, sea el VHC o el VIH, etc., hay que tener en cuenta que junto al aislado hay otros muchos que, por su escasa prevalencia, han tenido pocas probabilidades de haberse aislado y la enfermedad se ha podido producir por todos ellos, pero es posible que alguna de las variantes, aunque sean irrelevantes para el desarrollo del cuadro. En rigor no habría un solo genotipo al que se pueda atribuir la enfermedad, sino a una pléyade de variantes de los mismos, cada uno de los cuales tiene una proporción en el conjunto de esos virus. Naturalmente, la aparición de mutantes y recombinaciones no quiere decir que se mantengan, pues, como nos acaba de explicar, hay diversos mecanismos, especialmente la selección natural que sólo deja unos pocos; pero sigo con mi pensamiento. Si, como nos ha dicho, el VHC produce al día unas 3.000 variantes, al menos podemos presumir que queden tres o cuatro, etc. y al segundo día otras 3.000 variantes más las procedentes de aquellos 3 ó 4 que quedaron del primer día, y así sucesivamente. Cuando se identifica el genoma del virus causal, la probabilidad mayor es que se analice el más prevalente, pero eso no excluye la existencia de los demás. Por lo tanto, creo que es un salto psicológico en la asignación patogénica de una determinada secuencia un efecto dado como pudiera ser la hepatocancerogénesis, basándose en la asociación de la variante principal con la presentación de la enfermedad, pues bien pudiera ocurrir que la causa fuera una o varias secuencias de las variantes genotípicas minoritarias. La importancia de estas variantes excede la propia patogenia, pues a ellas pudiera deberse la emergencia de nuevos virus patógenos como la reciente epidemia de gripe aviaria y sobre todo el agente del SARS. En el caso del hepatocarcinoma habría que determinar el genotipo de las cepas aisladas del propio tumor. Reitero nuevamente su admiración y mi felicitación.

Prof. Rey Calero

La Profesora Maroto nos trae un importante tema, como son diversos aspectos de la infección por VHC, y lo ha hecho con gran precisión y maestría, por lo que merece la más entusiástica felicitación.

Ha aborado un serio problema que afecta a más de 200 M de infectados, y, de acuerdo con las últimas reuniones de hepatólogos, 1 M están infestados en nuestro país y más de 5 M en Europa, sobre todo en las zonas del sur y del este.

Se incluye este virus monocatenario, +RNA, dentro de la gran familia de los *Flavivirus*, en la que se describen los géneros *Flavivirus*, que les da nombre por pertenecer el virus de la fiebre amarilla (flavus), junto con los 4 del dengue, encefalitis japónica, etc. El 2.º género descrito son los *pestivirus*, en los que destaca el BVD (Bovine Virus Diarrhea), que causa diarreas y neumonías en los terneros y ganado vacuno, temibles en estas explotaciones ganaderas. El 3.º género lo constituyen los *VHC (Hepacivirus)*, con características de ambos, pero con propiedades específicas, de las que nos ha ilustrado excelentemente la Prof. Maroto.

La principal vía de contagio en éstos son las transfusiones, los drogadictos UDVP; también se ha de considerar como una ETS, etc. Los UDVP, como suelen utilizar las drogas compartiendo jeringas y la promiscuidad, facilitan pues el intercambio de estos virus. Los tipos y subtipos con los que se infectan pueden ser varios, los más frecuentes desde el punto de vista epidemiológico, como nos ha indicado, son el 1b, 1a, 2a, 4a. Éste es muy frecuente en Egipto. El que una persona pueda ser infectada por distintos subtipos, aparte de las «cuasiespecies» que nos ha descrito, ya nos habla de las dificultades para conseguir el control inmunológico mediante vacunas.

El tratamiento con dosis ajustadas al peso con peginterferón y ribavirina han conseguido que se incremente la esperanza de vida en unos 4,7 años. Como indicaba que la vacuna está a largo plazo, quería comentarle las esperanzas puestas en los trabajos de Richardson y su equipo de oncología de Toronto, provocando la apoptosis de las células hepáticas infestadas con VHC. Utilizan ratones quimeras con hepatocitos análogos a los humanos, susceptibles de ser atacados por VHC que degradan las proteasas. Mediante adenovirus consiguen introducir en dichas células infestadas el precursor BID que presenta un área de identificación con la proteasa del VHC, produciendo la apop-

tosis en estas células infestadas y no en las normales, con lo que desciende la carga viral. Así, pues, esta terapia génica de los trabajos experimentales podrá abrir nuevas perspectivas a considerar en el futuro. Reitero, pues, mi felicitación cordial por tan importante y sugerente comunicación. Enhorabuena.

Profesor Espinós Pérez

La Prof. Maroto es siempre exhaustiva en sus comunicaciones; hoy lo ha sido también. Le felicito.

Es un tema de gran complejidad y ha quedado claro que se requiere mucho estudio e investigación hasta poder encontrar una solución adecuada. También ha quedado claro que en la actualidad el panorama de la hepatitis C es sombrío.

Es evidente que el subgrupo 1 B del virus es de peor pronóstico. También es cierto que en España este subgrupo es el más frecuente. La Prof. Maroto lo ha encontrado en el 57 % de una población de reclusos, entre los que la drogadicción es muy frecuente. ¿Qué papel puede tener este colectivo en el hecho de que entre la población general, no reclusos, el subgrupo 1B es también el más frecuente? No podemos olvidar que hay un número de enfermos con hepatitis C en los que no se evidencia ninguna fuente de contagio.

¿Qué subtipo es el que con mayor frecuencia produce manifestaciones extrahepáticas?

¿Es posible en la clínica la valoración de la Pk9 para conocer la posible respuesta al interferón?

Parece evidente que la gran variabilidad del virus de la hepatitis C hace imposible la obtención de vacunas; así lo ha señalado la Prof. Maroto. Quiero señalar que hace unas pocas semanas apareció en la prensa médica, prensa de divulgación, una noticia en la que se señalaba que un grupo de investigadores disponía ya de una vacunación eficaz que muy pronto estaría en el mercado. Parecía evidente que una industria farmacéutica apoyaba esta investigación. ¿Tiene Vd. conocimiento de esto? Según lo que acabamos de oír, no parece que sea cierta esta noticia. ¿No cree que esta noticia puede crear falsas esperanzas? ¿Cree Vd. que se debería ser más estrictos en publicar afirmaciones como éstas? ¿Cree Vd. que debería haber una «ética» de la información?

Le agradezco mucho esta interesante comunicación.

CONTESTACIÓN

Al Prof. Domínguez Carmona

El Prof. Domínguez Carmona tiene razón en sus divagaciones de la gran capacidad de diversificación del VHC. Pero no es lo mismo hablar de genotipos, de subtipos o de cuasiespecies. Es decir, que cuando yo decía que un virus parental puede dar lugar a una gran variabilidad en un mismo día y en un mismo individuo, me estoy refiriendo a cuasiespecies y, por supuesto, no hablo en absoluto de genotipos y de subtipos,. En uno de los momentos, ponía una diapositiva en la que decía que en el caso de las cuasiespecies había una homología de más del 98 %, es decir, que la diversidad entre ellas es muy pequeña, siendo la mayoría de esas partículas receptoras. El problema es poder estudiarlas correctamente y aun cuando hoy en día disponemos de técnicas muy sensibles como las de Heteroduplex Mobility Assay (HMA), las de SCP, las de restricción de fragmentos de las endonucleasas o las de secuenciación, realmente sigue siendo un tema complejo.

Tal como dice el Prof. Domínguez Carmona, su capacidad de mutación hace que crezcan de una forma importante, pero no exponencial (como haría, por ejemplo, *Escheridia coli*), ya que el hecho de la existencia o la carencia de determinados enzimas, hace que en alguna manera exista un determinado control. Aún así, en estos individuos existe una gran variabilidad de cuasiespecies.

Por último, quiero dar las gracias a todos los Señores Académicos que han intervenido, por sus cariñosas felicitaciones, así como por sus aportaciones que, como siempre, han sido muy valiosas.

Al Prof. Rey Calero

El Prof. Rey Calero, además de hacer un magnífico repaso a todo el tema del VHC sobre el que nosotros no hemos querido entrar por su magnitud, nos habla de los principales genotipos. Indudablemente, como él señala, el más frecuente en nuestro país es el 1b, pero tenemos otra serie de ellos como el 4a, el 2, 3 e incluso mixtos y dependientes además del grupo de riesgo, ya que en el caso de los drogadictos es muy frecuente el 1a.

Igualmente nos habla de un experimento en Toronto provocando

apoptosis en las células infectadas. Algo parecido hicimos hace unos años en nuestro Departamento en leucocitos de individuos VIH e individuos controles, mediante procesos de estimulación con fitohemaglutinina y concavalina para estudiar, por tinción, fenómenos de apoptosis. Los resultados obtenidos en ambos grupos eran totalmente diferentes, lo cual nos hizo pensar en su posible papel en determinados procesos infecciosos. Es probable que también lo juegue en el VHC, pero todavía necesita un mayor estudio en profundidad.

Debido a todo ello, y ya que los tratamientos actuales con Interferón pegilado y Ribavirina no son efectivos en todos los casos, indudablemente el camino de la apoptosis es una vía fisiológica de actuación, pero más difícil desde el punto de vista terapéutico. A mí personalmente me gustaría que me siguieran buscando otras vías más directas, como ocurrió en el tema del VIH.

Al Prof. Espinós Pérez

El Prof. Espinós, como siempre, ha planteado una serie de preguntas muy inteligentes. En primer lugar, el papel jugado por los drogadictos. Indudablemente, la forma de transmisión parenteral, como ocurre con las transfusiones, sigue siendo, al igual que en el VIH, una forma clara de transmisión y de difusión. El problema principal de la infección VHC, como señala muy bien el Prof. Espinós, es que existe un amplio colectivo de enfermos con hepatitis C en los que no se evidencia cuál fue la fuente de contagio. No debemos olvidar, por otra parte, su posible transmisión sexual, aunque ésta sea mucho menor que en el caso del virus B o del VIH.

El estudio del papel de PKR en la posible respuesta al Interferón, así como el de la región ISDR (Región Determinante de la Sensibilidad al Interferón) es una vía de investigación abierta con muchas posibilidades tal y como ya he reseñado, pero que, en este momento, no forma parte de una rutina diaria que se pueda utilizar en la clínica.

Por último, en relación a las vacunas, veo difícil, a pesar de las numerosas líneas abiertas, una viabilidad a corto plazo por los múltiples problemas que conlleva el VHC (imposibilidad de cultivo, gran variabilidad genética, ausencia de buenos animales de experimentación, etc.). Por eso creo que las múltiples noticias que nos llegan a través de los medios de comunicación pueden crear, como

dice el Prof. Espinós, falsas esperanzas. Estoy de acuerdo en que se debería ser más estricto y mantener un mayor rigor científico en todo tipo de información al público en general.

PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE

Hemos tenido hoy una gran sesión de actualización microbiológica. Felicito a los dos ponentes. Son unos aspectos que en la clínica nos interesan muchísimo a los que hemos ejercido y ejercemos la medicina, las infecciones urinarias son de una reiteración pero poco a poco se va aclarando el por qué se reiteran, como muy bien nos ha demostrado el Prof. Piédrola. El múltiple campo de las adeninas, su relación con las mutaciones que hay a nivel del E. coli, de enterococos, de proteus, que son de las más frecuentes infecciones urinarias que tenemos que tratar los clínicos en su reiteración, abren nuevas perspectivas, que al final de ellas el tratamiento quimioantibiótico tendrá, sin duda, refuerzo importante.

Debo aprovechar este momento para agradecer a estos especialistas microbiólogos, que dejáis, como se decía clásicamente, vuestras pestañas en el trabajo asiduo de ver cómo se hace más importante la lucha antimicrobiana; vuestro esfuerzo, vuestro trabajo, vuestro interés y lo mucho que aclaráis en los aspectos de la patología general y de la terapéutica en las infecciones humanas.

La Dra. Maroto se dedica al estudio de la gran variabilidad de los virus, que explica la distinta gravedad en la clínica de las infecciones virales, que son mu distintas de una a otra persona. Los clínicos lo achacamos al condicionamiento patogénico de las personas, la disminución de las respuestas, las enfermedades asociadas a la diabetes... En esa variabilidad de los virus sin duda existe un alto porcentaje de motivos de la gravedad diversa de las infecciones virales. En eso radica, creo yo, el misterio de esa distinta variabilidad; una gripe es muy distinta de un enfermo a otro, de un hermano a otro hermano sometidos al mismo momento del contagio. Posiblemente, por esta vía del estudio de la variabilidad en los aspectos más importantes de la profunda microbiología y de la virología podrán entreabrirse muchas de las incógnitas o de los caminos futuros. Variabilidad de los virus que desde luego explican, en el virus de la hepatitis C, las alteraciones muy diversas de uno a otro enfermo en los problemas extrahepáticos, en la infección, que nos

sorprende a los clínicos, cual es esa variabilidad clínica; ahí está la respuesta, la variabilidad que vosotros estudiáis en el profundo mundo de los virus, es también cuando infectan al hombre, responsable por mecanismos no conocidos todavía bien, de la distinta gravedad de las infecciones por el virus C.

Y no digamos ya el misterio en el por qué el virus VHC con su variabilidad genética, por qué mecanismos se genera en algunos una cronicidad tremenda; otros una remisión menos frecuente de la que deseamos los clínicos, y en otros, el hepatocarcinoma. El problema de la génesis de hepatocarcinoma infectado por el virus C sigue siendo un gran problema. Os estáis acercando mucho al por qué de esas cosas; son problemas graves que con vuestro estudio, con vuestra dedicación, con vuestro esfuerzo se están aclarando. Gracias a vosotros, gracias al mundo de la microbiología, gracias a los microbiólogos como entonces y ahora se siguen aclarando problemas de la patología humana.

Se levanta la sesión.